

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

08. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月 8日

出願番号
Application Number: 特願2003-103576
[ST. 10/C]: [JP2003-103576]

出願人
Applicant(s): 三菱ウェルファーマ株式会社

REC'D 03 JUN 2004

WIPO

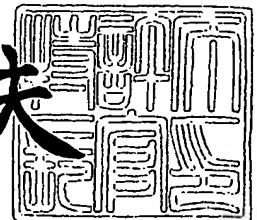
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 YK02012
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 31/00

A61P 9/10
C07D247/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 山田 久美

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 山本 登志弘 |

【特許出願人】

【識別番号】 000006725

【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100082511

【氏名又は名称】 高柳 昌生

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013114

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 0114651

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患の予防及び／又は治療剤。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞の組織において、過剰発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidaseに対する阻害作用、又は、NAD(P)H oxidase活性化の過程に対する阻害作用を有する化合物を有効成分として含有するNAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患の予防及び／又は治療剤。

【請求項 2】 NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化が、糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満、喫煙、心不全、心肥大、虚血性心疾患、又は、血管再開通療法若しくは臓器移植術の虚血再灌流により生じたものである請求項 1 に記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項 3】 NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化が、ガン、又は、痴呆症により生じたものである請求項 1 に記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項 4】 NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化が、抗ガン剤、又は、硝酸製剤使用により生じたものである請求項 1 に記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項 5】 NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患が、糖尿病性合併症、虚血性心疾患、心不全、動脈硬化症、血管再開通療法による再閉塞若しくは再狭窄、再灌流障害若しくは臓器移植後の障害、硝酸製剤耐性、抗ガン剤の副作用、痴呆症、脳卒中、又は、ガンの進展である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の予防及び／又は治療剤。

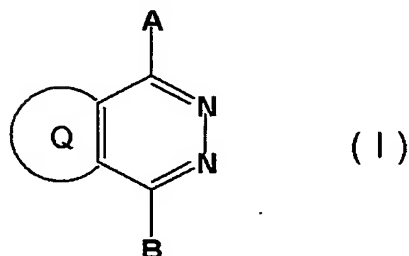
【請求項 6】 動脈硬化症が、冠状動脈疾患、アテローム性血栓性脳梗塞、末梢動脈閉塞症、腎硬化症、又は、血管障害性痴呆症である請求項 5 に記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項 7】 虚血性心疾患が狭心症、心筋梗塞、不整脈、又は、心室性頻拍である請求項 5 に記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項 8】脳卒中が脳梗塞、ラクナ梗塞、一過性脳虚血、くも膜下出血、又は、脳出血である請求項 5 に記載の予防及び／又は治療薬。

【請求項 9】化合物が、下記一般式 (I) から (VIII)

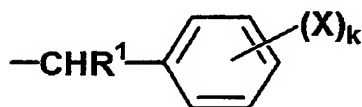
【化 1】



〔式中、AはC₃～C₆アルキル、C₅～C₇シクロアルキル、又は、それぞれがC₁～C₄アルキル、C₁～C₄アルコキシ、若しくは、ハロゲン原子から選ばれる1以上の置換基を有していてもよいフェニル、チエニル、フリル、チアゾリル、フェノキシ、C₇～C₉フェニルアルキル、フェニルチオ、含窒素飽和環基、ピリジル、若しくは、イミダゾリルを表し、

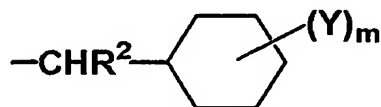
Bは-NH-D〔Dは

【化 2】



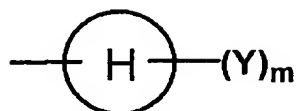
〔式中、R¹は水素原子、又は、C₁～C₄アルキルを表し、Xはそれぞれ独立してハロゲン原子、C₁～C₄アルキル、又は、C₁～C₄アルコキシを表し、kは0～3の整数を表す。〕、

【化 3】



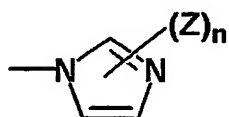
〔式中、R²は水素原子、又は、C₁～C₄アルキルを表し、Yはそれぞれ独立してC₁～C₄アルキル、又は、C₁～C₄アルコキシを表すか、任意の2つのYが連結してC₁～C₃アルキルで置換されていてもよいC₁～C₃アルキレンを形成し、mは0～6の整数を表す。〕、

【化4】



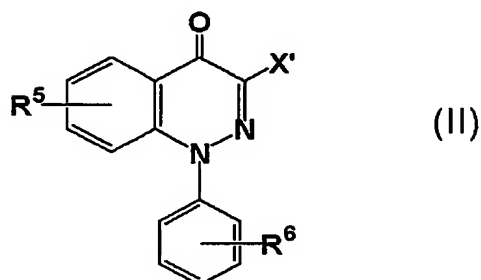
(式中、環HはC₅～C₇シクロアルキルを表し、Y及びmは前記と同義である。)、-CHR³R⁴ (式中、R³はC₁～C₅アルキルを表し、R⁴はC₅～C₈シクロアルキル、又は、チエニルを表す。)、又は、C₃～C₈アルキルを表す。]、又は、

【化5】



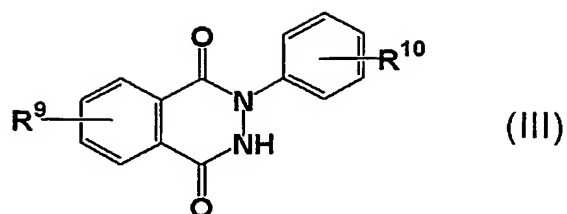
(式中、Zはそれぞれ独立してC₁～C₄アルキル、又は、フェニルを表し、nは0～2の整数を表す。)を表し、Qはベンゼン環、フラン環、又は、C₁～C₄アルキルで置換されていても良いチオフェン環を示す。}、

【化6】



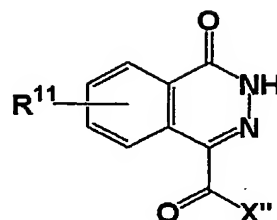
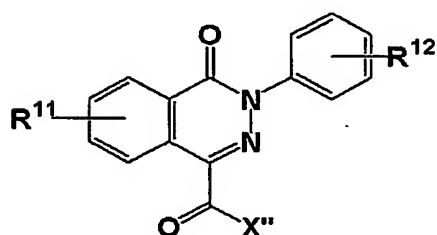
[式中、R⁵、R⁶はそれぞれ独立して水素原子、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示し、X' は-COOR⁷ (R⁷は水素原子、又は、置換されていてもよいC₁～C₆アルキルを示す。)、-CONH₂、-CN、-COR⁸ (式中、R⁸は置換されていてもよいC₁～C₆アルキル、又は、置換されていてもよいアリールを示す。)、-NH₂、-NO₂、又は、-OR⁷ (式中、R⁷は前記と同義である。)を示す。]、

【化 7】



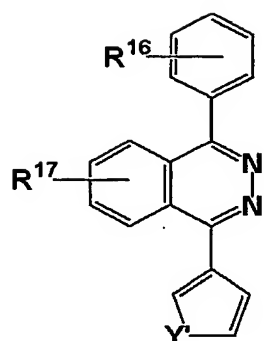
(式中、 R^9 、 R^{10} はそれぞれ独立して水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示す。)、

【化 8】

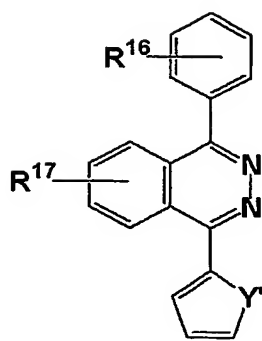


[式中、 R^{11} 、 R^{12} はそれぞれ独立して水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示し、 X'' は $-OR^{13}$ (式中、 R^{13} は水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は、アリールを示す。)、又は、 $-NR^{14}R^{15}$ (式中、 R^{14} 、 R^{15} はそれぞれ独立して水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は、アリールを示す。)]、

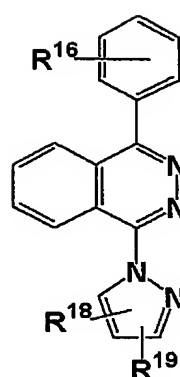
【化9】



(VI)



(VII)



(VIII)

(式中、R¹⁶、R¹⁷はそれぞれ独立して水素原子、C₁～C₆アルキル、アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示し、R¹⁸、R¹⁹はそれぞれ独立して水素原子、又は、C₁～C₆アルキルを示し、Y'は酸素原子、又は、硫黄原子を示す。)で表される化合物、又は、その薬理学上許容される塩である、請求項1から8のいずれかに記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項10】脂質低下剤、降圧剤、血糖低下剤、血管拡張剤、抗血小板剤、抗凝固剤、脳保護薬、抗ガン剤、利尿剤、強心薬、鎮痛薬、抗浮腫薬、血栓溶解剤、免疫抑制剤、ステロイド、ビタミン剤、又は、抗酸化剤と同時に若しくは別々に、又は、逐次的に投与する形態で有効成分を含むことを特徴とする請求項1から9のいずれかに記載の予防及び／又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、NAD(P)H oxidase (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase、以下、NAD(P)H oxidaseと記すこともある。)過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患の予防及び／又は治療剤に関する。

より詳細には、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞等の組織において、過剰発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidaseに対する阻害

作用、又は、NAD(P)H oxidase活性化の過程に対する阻害作用を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とするNAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患の予防及び／又は治療剤に関する。

【従来の技術】

【0002】

高脂血症、高血圧、糖尿病、肥満、加齢又は、喫煙等の種々のリスクファクターにより、虚血性心疾患（心筋梗塞、又は、狭心症等）、脳卒中（脑梗塞、脳出血、またはくも膜下出血等）、動脈硬化、又は、末梢循環障害（末梢動脈閉塞症等）等の発症若しくは症状増悪がおこる。これら疾患の発症若しくは症状増悪に関して酸化ストレスの重要性がクローズアップされている。

また、ガン増殖（非特許文献1参照）、アルツハイマー病の増悪（非特許文献2参照）、抗ガン剤による副作用（非特許文献3参照）、又は、狭心症患者の硝酸塩製剤治療による薬剤耐性（非特許文献4参照）における酸化ストレスの関与も報告されている。

従来、上記の酸化ストレス、すなわち活性酸素（以下・ O_2^- と記す。）の産生源としては、白血球系細胞が主体であると考えられてきた。近年、血管細胞系や心筋細胞等様々な細胞種での・ O_2^- 産生が確認されており、これら細胞の・ O_2^- 産生酵素として、NAD(P)H oxidaseが注目されている（非特許文献5参照）。

NAD(P)H oxidaseは、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞等に存在する生体内酵素の一つであり、NADH又はNADPHを基質として・ O_2^- を産生する。

また、血管細胞系や心筋細胞等に存在するNAD(P)H oxidaseと白血球系細胞に存在するNADPH oxidaseとは酵素活性や活性調節機構に差異があり、それぞれのNADPH oxidaseは同一ではないと考えられている（非特許文献6参照）。

【0003】

NAD(P)H oxidase活性を抑制する化合物として、Diphenyleneiodonium（以下、DPIと記す。非特許文献7参照）、apocynin（特許文献1参照）、又は、S17834（非特許文献8参照）等が報告されているが、その抑制作用は血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞等の組織に存在するNAD(P)H ox

idaseに特異的ではない。

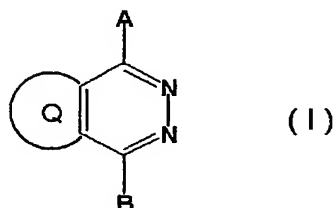
白血球系細胞のNADPH oxidaseの遺伝的欠損症である慢性肉芽種症 (Chronic granulomatous disease) の患者では、白血球系細胞の $\cdot O_2$ -産生能が低下しており、細菌等に対する殺菌能が損なわれているため、易感染性あるいは免疫力の低下を起こすことが知られている (非特許文献9 参照)。

従来知られている非特異的NAD(P)H oxidase阻害剤は白血球系細胞のNADPH oxidaseをも阻害するため、それらをNAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidaseの活性化に起因する疾患に対する予防及び／又は治療剤として臨床応用することは困難と考えられる。加えて、非特異的NAD(P)H oxidase阻害剤は、過剰発現又は活性化していない状態 (即ち、正常の状態) のNAD(P)H oxidaseによる活性酸素産生も抑制するため、長期の投与で血管機能の低下等の副作用が懸念される。

【0004】

一方、下記一般式 (I)

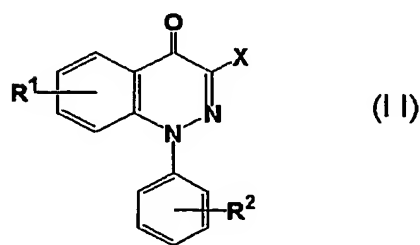
【化10】



で表される化合物として、3, 6-ジ置換ピリダジン誘導体 (特許文献2 参照) が知られており、その抗血小板作用が報告されている。

また、下記一般式 (II)

【化11】



の化合物として、化学的ハイブリッド剤 (chemical hybridization agent) であ

るシノリノン誘導体（特許文献 3 参照）、花粉抑制剤（pollen suppressant）であるシノリノン-3-カルボン酸誘導体（特許文献 4 参照）、アセチルコリン、ヒスタミン、又は、ロイコトリエン D 4 への拮抗作用を示すシノリノン誘導体（特許文献 5 参照）等の報告がある。しかしながら、これらの報告には、前記誘導体が、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞等の組織において、種々のリスクファクターや病態により過剰に発現若しくは活性化した NAD(P)H oxidase のみに対する阻害作用、又は、NAD(P)H oxidase の活性化の過程に対する阻害作用を有することについての記載あるいは示唆は無い。

【特許文献 1】

国際公開公報 W001/89517 号

【特許文献 2】

日本特許公報第 2730421 号

【特許文献 3】

欧州公開公報第 197226 号

【特許文献 4】

米国特許公報第 4729782 号

【特許文献 5】

国際公開公報 W093/09098 号

【非特許文献 1】

Gene. 2001, 269(1-2), 131

【非特許文献 2】

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 273(1), 5

【非特許文献 3】

Toxicology. 1999 May 3; 134(1): 51-62

【非特許文献 4】

J. Clinical Investigation, 1994, 187-194

【非特許文献 5】

Circ-Res. 2000. 86, 494-501

【非特許文献 6】

Cardiovascular Research, 1998, 38, 256-262

【非特許文献 7】

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, 253, 295

【非特許文献 8】

Arterioscler-Thromb-Vasc-Biol., 2001, 21:1577

【非特許文献 9】

J. Leukoc. Biol. 2001, 69, 191

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような現状に鑑み、NAD(P)H oxidase過剰発現若しくは活性化NAD(P)H oxidaseに起因する疾患に対する優れた予防及び／又は治療剤を提供することを目的とする。

【0 0 0 6】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞等の組織において、種々のリスクファクター、又は、病態により過剰発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidaseに対する阻害作用、又は、NAD(P)H oxidase活性化の過程に対して阻害作用を有する化合物がNAD(P)H oxidase過剰発現若しくは活性化に起因する疾患に対し優れた予防及び／又は治療剤となることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0 0 0 7】

すなわち、本発明は、以下の通りである。

本発明は、以下の予防及び／又は治療剤に関する。

(1) 血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞の組織において、過剰発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidaseに対する阻害作用、又は、NAD(P)H oxidase活性化の過程に対する阻害作用を有する化合物を有効成分として含有するNAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患の予防及び／又は治療剤、

(2) NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化が、糖尿病、高

血圧、高脂血症、肥満、喫煙、心不全、心肥大、虚血性心疾患、又は、血管再開通療法若しくは臓器移植術の虚血再灌流により生じたものである前記(1)に記載の予防及び／又は治療剤、

(3) NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化が、ガン、又は、痴呆症により生じたものである前記(1)に記載の予防及び／又は治療剤、

(4) NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化が、抗ガン剤、又は、硝酸製剤使用により生じたものである前記(1)に記載の予防及び／又は治療剤、

(5) NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患が、糖尿病性合併症、虚血性心疾患、心不全、動脈硬化症、血管再開通療法による再開塞若しくは再狭窄、再灌流障害若しくは臓器移植後の障害、硝酸製剤耐性、抗ガン剤の副作用、痴呆症、脳卒中、又は、ガンの進展である前記(1)から(4)のいずれかに記載の予防及び／又は治療剤、

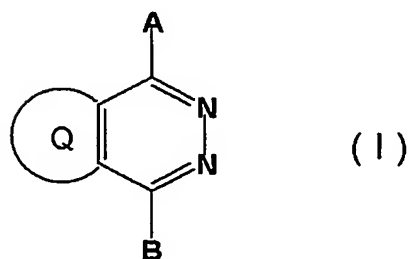
(6) 動脈硬化症が、冠状動脈疾患、アテローム性血栓性脳梗塞、末梢動脈閉塞症、腎硬化症、又は、血管障害性痴呆症である前記(5)に記載の予防及び／又は治療剤、

(7) 虚血性心疾患が狭心症、心筋梗塞、不整脈、又は、心室性頻拍である前記(5)に記載の予防及び／又は治療剤、

(8) 脳卒中が脳梗塞、ラクナ梗塞、一過性脳虚血、くも膜下出血、又は、脳出血である前記(5)に記載の予防及び／又は治療薬、

(9) 化合物が、下記一般式(I)から(VIII)

【化12】

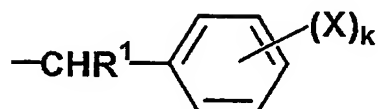


〔式中、AはC₃～C₆アルキル、C₅～C₇シクロアルキル、又は、それぞれがC₁～C₄アルキル、C₁～C₄アルコキシ、若しくは、ハロゲン原子から選

ばれる 1 以上の置換基を有していてもよいフェニル、チエニル、フリル、チアゾリル、フェノキシ、C₇～C₉ フェニルアルキル、フェニルチオ、含窒素飽和環基、ピリジル、若しくは、イミダゾリルを表し、

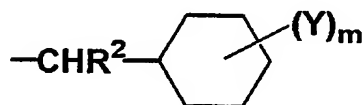
B は —NH—D [D は

【化 1 3】



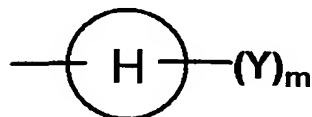
(式中、R¹ は水素原子、又は、C₁～C₄ アルキルを表し、X はそれぞれ独立してハロゲン原子、C₁～C₄ アルキル、又は、C₁～C₄ アルコキシを表し、k は 0～3 の整数を表す。)、

【化 1 4】



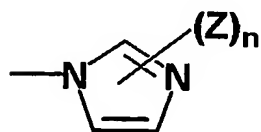
(式中、R² は水素原子、又は、C₁～C₄ アルキルを表し、Y はそれぞれ独立して C₁～C₄ アルキル、又は、C₁～C₄ アルコキシを表すか、任意の 2 つの Y が連結して C₁～C₃ アルキルで置換されていてもよい C₁～C₃ アルキレンを形成し、m は 0～6 の整数を表す。)、

【化 1 5】



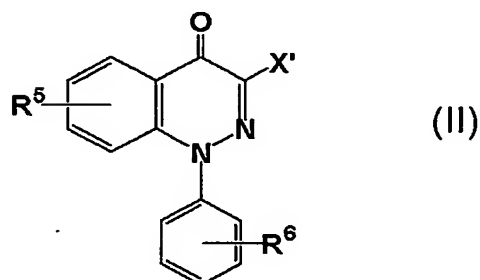
(式中、環 H は C₅～C₇ シクロアルキルを表し、Y 及び m は前記と同義である。)、 $\text{—CHR}^3\text{R}^4$ (式中、R³ は C₁～C₅ アルキルを表し、R⁴ は C₅～C₈ シクロアルキル、又は、チエニルを表す。)、又は、C₃～C₈ アルキルを表す。)、又は、

【化 1 6】



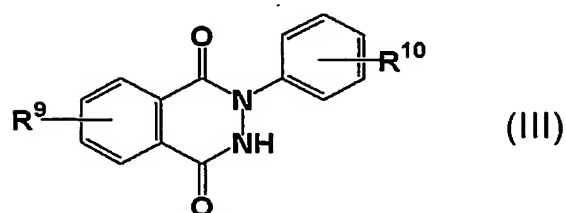
(式中、Zはそれぞれ独立してC₁～C₄アルキル、又は、フェニルを表し、nは0～2の整数を表す。)を表し、Qはベンゼン環、フラン環、又は、C₁～C₄アルキルで置換されていても良いチオフェン環を示す。}、

【化17】



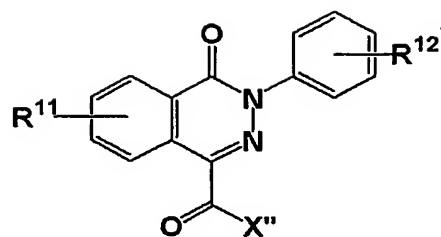
[式中、R⁵、R⁶はそれぞれ独立して水素原子、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示し、X' は-COOR⁷ (R⁷は水素原子、又は、置換されていてもよいC₁～C₆アルキルを示す。)、-CONH₂、-CN、-CO·R⁸ (式中、R⁸は置換されていてもよいC₁～C₆アルキル、又は、置換されていてもよいアリールを示す。)、-NH₂、-NO₂、又は、-OR⁷ (式中、R⁷は前記と同義である。)を示す。]、

【化18】

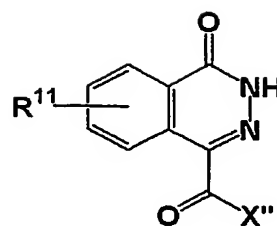


(式中、R⁹、R¹⁰はそれぞれ独立して水素原子、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示す。)、

【化19】



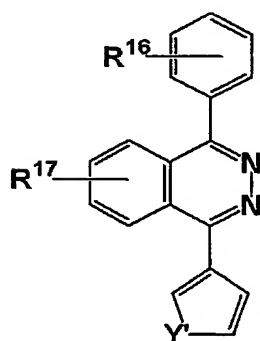
(IV)



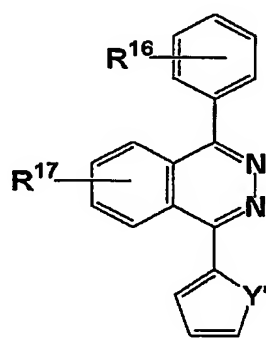
(V)

[式中、 R^{11} 、 R^{12} はそれぞれ独立して水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示し、 X'' は $-OR^{13}$ （式中、 R^{13} は水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は、アリールを示す。）、又は、 $-NR^{14}R^{15}$ （式中、 R^{14} 、 R^{15} はそれぞれ独立して水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は、アリールを示す。）]、

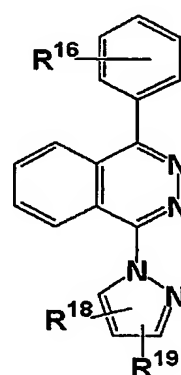
【化20】



(VI)



(VII)



(VIII)

(式中、 R^{16} 、 R^{17} はそれぞれ独立して水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル、又は、カルボキシルを示し、 R^{18} 、 R^{19} はそれぞれ独立して水素原子、又は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルを示し、 Y' は酸素原子、又は、硫黄原子を示す。)で表される化合物、又は、その薬理学上許容される塩である、前記(1)から(8)のいずれかに記載の予防及び／又は治療剤、又は、

(10) 脂質低下剤、降圧剤、血糖低下剤、血管拡張剤、抗血小板剤、抗凝固剤

、脳保護薬、抗ガン剤、利尿剤、強心薬、鎮痛薬、抗浮腫薬、血栓溶解剤、免疫抑制剤、ステロイド、ビタミン剤、又は、抗酸化剤と同時に若しくは別々に、又は、逐次的に投与する形態で有効成分を含むことを特徴とする前記（１）から（９）のいずれかに記載の予防及び／又は治療剤。

【0008】

【発明の実施の形態】

本明細書における各定義は次の通りである。

本明細書において「血管細胞系」とは、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、又は、泡沫化マクロファージ等であり、特に内皮細胞、又は、泡沫化マクロファージが好ましい。

本明細書において「過剰発現」とは、生体の恒常性（ホメオスタシス）にとって必要な発現量以上の発現であり、同一起源の正常組織にとって必要な発現量以上の発現である。

本明細書において「NAD(P)H oxidase」と表記した酵素は、NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide 以下、NADHと記す。) oxidase、NADH/NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate 以下、NADPH と記す。) oxidase、又は、NADPH oxidaseと表記することもあるが、NADH及びNADPH を基質として・O₂-産生する酵素である限りすべて本発明のNAD(P)H oxidaseに含まれる。

当該NAD(P)H oxidaseの発現部位としては、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞等の組織が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

本明細書において「活性化したNAD(P)H oxidase」とは、NAD(P)H oxidaseを構成する各サブユニットのうち、p47phox、p40phox、又は、p67phox等が細胞膜上にトランスロケーションされ、酵素機能（・O₂-産生）を発揮しうる状態にあるNAD(P)H oxidaseを意味する。

【0009】

本明細書において「過剰発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidaseに対する阻害作用」とは、既に過剰発現しているNAD(P)H oxidaseに対し、その酵素機能を発揮することが出来ないようにする作用、若しくは、既に酵素機能を発生し得る

状態のNAD(P)H oxidaseに対し、その酵素機能を阻害（又は抑制）する作用を意味する。

本明細書において「NAD(P)H oxidase活性化の過程に対する阻害作用」とは、NAD(P)H oxidaseとしての酵素機能を発揮するに至るまでに経るの全ての過程のうち、何れか1以上の過程を阻害（又は抑制）することを意味する。

具体的には、NAD(P)H oxidaseを構成する各サブユニットの発現阻害又は該サブユニットのトランスロケーション阻害等が本阻害作用に該当する。

本明細書において「過剰発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidaseに対する阻害作用、又は、NAD(P)H oxidase活性化の過程に対する阻害作用を有する化合物」とは、上述した阻害作用のうち少なくとも1つを阻害（又は、抑制）する作用を有する化合物であればよく、更に、これら既知のNAD(P)H oxidaseの作用以外のNAD(P)H oxidaseが関与する全ての生体内反応のうち少なくとも1つを阻害、又は、抑制する化合物をも含むものである。以下、本明細書中に「本発明の化合物」と記すこともあるが、その意味は、特に言及しない限り、本定義と同義である。

【0010】

本明細書において「NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化」を惹起する要因としては、糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満、喫煙、心不全、心肥大、虚血性心疾患、血管再開通療法、臓器移植術の虚血再灌流、ガン、痴呆症、又は、抗ガン剤若しくは硝酸製剤使用等が挙げられる。

本明細書において「NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患」（以下、「NAD(P)H oxidaseに起因する疾患」と記すこともあるが、その意味は、特に言及しない限り本定義と同義である。）としては、虚血性心疾患、心不全、糖尿病性合併症、動脈硬化症、血管再開通療法後の再狭窄若しくは再閉塞、臓器移植後の障害、脳卒中、硝酸製剤耐性、抗ガン剤副作用、痴呆症、又は、ガンの進展等が挙げられ、好ましくは虚血性心疾患、心不全、動脈硬化症、血管再開通療法後の再狭窄若しくは再閉塞、脳卒中、硝酸製剤耐性、抗ガン剤副作用、痴呆症、又は、ガンの進展等が挙げられ、より好ましくは虚血性心疾患、心不全、動脈硬化症、血管再開通療法後の再狭窄若しくは再閉塞、脳卒中、痴呆症、又は、ガンの進展等が挙げられ、最も好ましくは虚血性心疾患、動脈

硬化症、又は、脳卒中展等が挙げられる。

本発明のNAD(P)H oxidase過剰発現若しくは活性化NAD(P)H oxidaseに起因する疾患の予防及び／又は治療剤（以下、「本発明の予防及び／又は治療剤」と記すこともあるが、その意味は、特に言及しない限り本定義と同義である。）は、上記のようなNAD(P)H oxidaseが過剰発現若しくは活性化している患者、より好ましくはNAD(P)H oxidaseが過剰発現している患者に対し、前記NAD(P)H oxidaseに起因する疾患の予防及び／又は治療のために投与することを特徴とする。

【0011】

本明細書において「虚血性心疾患」とは、冠動脈病変により心筋虚血が惹起された結果発症する症候群であり、具体例としては狭心症、心筋梗塞不整脈又は心室性頻拍等が挙げられる。

本明細書において「血管再開通療法」とは、主に冠動脈硬化治療の方法であり、閉塞又は狭窄により低下した血流量を回復させる治療法を意味する。

本明細書において「動脈硬化症」とは、動脈の壁が厚くなって柔軟性を失ういくつかの疾患の総称である。これらの疾患のうち最も重要で最も多いのは、血管壁への脂質成分の沈着、マクロファージの浸潤、又は、平滑筋細胞の異常増殖若しくは遊走による血管壁の肥厚であり、具体例として、血管内腔の肥厚若しくは狭窄進展、血管内皮機能の低下、又は、血管脆弱化等の状態が挙げられる。

より具体的な例としては、冠状動脈疾患、アテローム性血栓性脳梗塞、末梢動脈閉塞症、腎硬化症、又は、血管障害性痴呆症が挙げられる。

本明細書において「冠状動脈疾患」とは、脂肪性沈着物又は血栓が冠状動脈壁の内層にある細胞内に蓄積し、血流を妨げている状態をいう。

本明細書において「アテローム性血栓性脳梗塞」とは、脂肪物質の大きな蓄積（アテローム又はプラーク）又は血栓により、動脈内の血流量が減少したり、動脈を完全に塞ぐことにより生じる。

本明細書において「血管障害性痴呆症」とは、小規模な脳卒中により、徐々に脳組織が破壊れて生じる疾患であり、多発脳梗塞性痴呆とも呼ばれる。

【0012】

本明細書において、前記一般式(I)で表される化合物としては、日本特許公報

第2730421号に記載された化合物等を挙げることが出来る。これらの化合物の製造方法及び抗血小板作用は、上記明細書に記載されている。

前記一般式(II)で表される化合物は、J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1974, 752、Synthesis 1983, 52、欧州公開公報第197226号、米国特許公報第4729782号、国際公開公報W09309098等に記載された方法に準じて合成することが出来る。

前記一般式(III)で表される化合物は、Tetrahedron Lett., 37, 1996, 24, 4145等に記載された方法に準じて合成することが出来る。

前記一般式(IV)で表される化合物は、Heterocycles (1981), 16(1), 25-30等に記載された方法に準じて合成することが出来る。

前記一般式(V)で表される化合物は、Shenyang Yaoke Daxue Xuebao(2001), 18(2), 106-109、Chem. Pharm. Bull. (1980), 28(9), 2763-9、Heterocycles (1981), 16(1), 25-30等の文献に記載された方法に準じて合成することが出来る。

前記一般式(VI)で表される化合物は、日本公開公報特開2001-335476号等に記載された方法に準じて合成することが出来る。

前記一般式(VII)で表される化合物は、Tetrahedron Lett. (1986), 27(7), 869-872等に記載された方法に準じて合成することが出来る。

前記一般式(VIII)で表される化合物は、Pharmazie, 46, 2, 1991, 105-8等に記載された方法に準じて合成することが出来る。

【0013】

前記、式(I)～(VIII)の化合物の塩としては、酸付加塩、又は、塩基付加塩を用いることができる。例えば、塩酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩、若しくはリン酸塩等の鉱酸塩；メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩、酢酸塩、シユウ酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩、若しくはフマル酸塩等の有機酸塩；ナトリウム塩、カリウム塩、若しくはマグネシウム塩などの金属塩；アンモニウム塩；又は、エタノールアミン若しくは2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール等の有機アミン塩等を用いることが出来るが、生理的に許容されるものであれば塩の種類は特に限定されることはない。

【0014】

本発明の化合物は、実施例において詳述するように、きわめて良好な薬理作用

を有する。従って、本発明の化合物は、NAD(P)H oxidaseに起因する疾患、特に虚血性心疾患、動脈硬化性疾患、脳卒中、又は、糖尿病性合併症等の予防剤及び／又は治療剤の有効成分として、極めて有効である。

また、本発明の予防及び／又は治療剤は、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア、又は、腫瘍細胞等の組織において、過剰発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidase、好ましくは過剰発現したNAD(P)H oxidaseに対する阻害作用、又は、NAD(P)H oxidase活性化の過程に対して阻害作用を有する化合物を有効成分とし、白血球系細胞のNADPH oxidase等、他の類似酵素及び正常状態のNAD(P)H oxidaseを阻害しないため、免疫機能の低下や易感染性等の副作用を回避することができる。

【0015】

本発明の予防及び／又は治療剤は、本発明の化合物を有効成分とするものであり、これを製剤化する場合、通常用いられる適当な希釈剤や他の添加剤とともに適当な投与形態（粉末剤、注射剤、錠剤、カプセル剤、又は、局所外用剤等）に調整することが出来る。上記製剤は、その投与形態に応じた適当な投与方法（静脈内投与、経口投与、経皮投与、又は、局所投与等）によって、ヒト、又は、動物に投与することが出来る。

【0016】

本発明の予防及び／又は治療剤として有効成分である前記式 (I) ~ (VIII) の化合物又はその塩の1種又は2種以上をそのまま患者に投与してもよいが、好ましくは、有効成分と薬理学的及び製剤学的に許容しうる添加物を加え、当業者に周知な形態の製剤として提供されるべきである。

薬理学的及び製剤学的に許容しうる添加物として、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、及び等張化剤等が挙げられる。

経口投与に適する製剤の例として、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、又はシロップ剤等が挙げられる。また、非経口投与に適する製剤の例として、注射剤、点滴剤、又は坐剤等が挙げられる。

【0017】

また、本発明の予防及び／又は治療剤は、各種降圧剤、脂質低下剤、血糖低下剤

、血管拡張剤、抗血小板剤、抗凝固剤、脳保護薬、抗ガン剤、又は、ビタミン剤等と併用してもよい。

【0018】

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口的、又は、非経口的に投与することが出来る。例えば、NAD(P)H oxidaseに起因する疾患、好ましくはNAD(P)H oxidase過剰発現に起因する疾患を発症した患者に対し、症状の悪化の防止ないしは症状の軽減などを目的として、経口的に投与することがより好ましい。

【0019】

本発明の予防及び／又は治療剤の投与量は、NAD(P)H oxidaseに起因する疾患の予防及び／又は治療の目的、患者の年齢や状態などの条件に応じて適宜選択可能である。一般的には、成人に対して0.001～100mg/kg程度を非経口的に投与するか、0.001～100mg/kg程度を経口的に投与することが好ましい。

【0020】

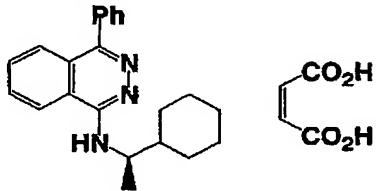

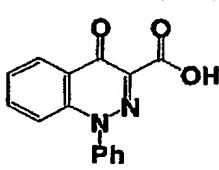
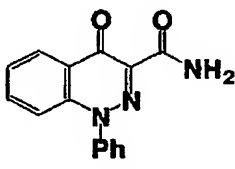
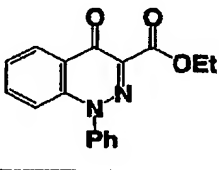
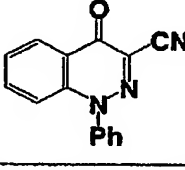
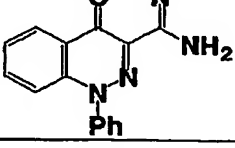
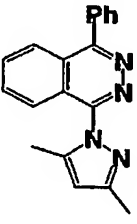
【実施例】

以下、本発明について実施例を挙げて詳細に説明するが、その要旨を越えない限り、本発明は以下に限定されるものではない。

【0021】

以下の各実験に使用した化合物の構造式と合成方法を下表に示した。

【表 1】

	構造式	合成方法
化合物 A		日本特許公報第2730421号に記載された方法に準じて合成した。
化合物 B		日本特許公報第2730421号に記載された方法に準じて合成した。
化合物 C		欧州公開公報第197226号、米国特許公報第4729782号及び国際公開公報W093/09098号、Synthesis 1983, 52、又は、J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1974, 752に記載された方法に準じて合成した。
化合物 D		欧州公開公報第197226号、米国特許公報第4729782号及び国際公開公報W093/09098号、Synthesis 1983, 52、又は、J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1974, 752に記載された方法に準じて合成した。
化合物 E		欧州公開公報第197226号、米国特許公報第4729782号及び国際公開公報W093/09098号、Synthesis 1983, 52、又は、J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1974, 752に記載された方法に準じて合成した。
化合物 F		欧州公開公報第197226号、米国特許公報第4729782号及び国際公開公報W093/09098号、Synthesis 1983, 52、又は、J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1974, 752に記載された方法に準じて合成した。
化合物 G		化合物Fにヒドロキシアミン塩酸塩、炭酸ナトリウムを加えエタノール-水混合溶液中で加熱して合成した (Synth. Commun. 28, 23, 1998, 4419等参照)。
化合物 H		Pharmazie, 46, 2, 1991, 105-8に記載された方法に準じて合成した。

【0022】

試験例 1 NAD(P)H oxidase活性増加抑制作用

(方法)

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: Bio Whitaker社より購入。以下、HUVECと記す。) に44mM Glucoseを添加、高糖下、約1週間培養し、界面活性剤を含むLysis bufferに細胞を溶解させた。高糖下、過剰発現、又は、活性化したNAD(P)H oxidaseにより産生増加したInterleukin-8(以下、IL-8と記す。)を固相酵素免疫検定法 (enzyme-linked immuno solvent assay 以下、ELISAと記す。) で測定した。産生増加したIL-8量を指標に化合物のNAD(P)H oxidase抑制作用を検討した。

被験化合物を添加し高糖下培養した細胞のIL-8産生をA、溶媒を添加し高糖培養した細胞のIL-8産生をB、正常糖濃度で培養した細胞のIL-8産生をCとし、以下のように抑制率を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - \left((A - C) / (B - C) \right) \times 100$$

IC₅₀値は、得られた抑制率をもとに最小二乗法により求めた用量作用直線から算出した。結果を下記表に記す。

【0023】

【表 2】

代表化合物のIL-8産生抑制作用				
	抑制率（％）			IC ₅₀ 値（μM）
	化合物濃度（μM）			
	0.01	0.1	1	
化合物A	39.5	59.8	74	0.0063
化合物B	63.8	77.8	72.0	< 0.01
化合物C	-2.5	53.7	97.7	0.0154
化合物D	45.4	98.3	100	0.0111
化合物E	96.3		91.0	< 0.01
化合物F	0	0	54.5	0.943
化合物G	39.7	43.9	57.4	0.219
化合物H	27.6	49.9	83.0	0.069

【0024】

(結果)

化合物 A-H は NAD(P)H oxidase 抑制作用の指標である産生増加した IL-8 量を抑制した。すなわち本発明の化合物は、NAD(P)H oxidase 過剰発現及び／又は NAD(P)H oxidase 活性化の過程を抑制すること意味する。

【0025】

試験例 2 NAD(P)H oxidase 過剰発現、又は、NAD(P)H oxidase 活性化抑制作用
(方法)

Wistar 系ラット (雄性、日本 SLC より購入) の尾静脈より 0.05M クエン酸バッファ (pH4.5) に溶解したストレプトゾトシン (以下、STZ と記す。) 40 mg/kg を静脈内投与し、糖尿病ラットを作成した。

STZ静注1週間～8週間後に、尾静脈よりヘパリン処理したキャピラリーを用いて採血し、直ちに氷冷後、3000rpm, 15min, 4℃で遠心分離して血清を得た。血糖値は、グルコース測定用キット“GLUネオ シノテスト”（シノテスト社）を用いて酵素法で測定した。測定はマイクロプレートリーダー（SPECTRA MAX250, Molecular Devices社）で行った。

糖尿病ラットに3日間化合物を1日1回経口投薬した。大動脈の・O₂-産生測定日には化合物は投薬しなかった。

NAD(P)H oxidase活性は大動脈の・O₂-産生を指標とし、David. G. Harrisonらの方法（J. Clin. Invest. 91, 2546-2551, 1993）を改良して行った。詳しい方法は以下の通りである。

【0026】

正常ラット及び糖尿病ラットの腹部大動脈より放血した後、胸部大動脈を摘出した。摘出した大動脈をKrebs-Hepes buffer中に浸し、周辺組織を除き、約5mmのリング標本を作製した。リング標本をKrebs-Hepes buffer中、37℃、10分間ブレインキュベートした後、リング標本を0.25mM lucigenin(SIGMAより購入。)を含むKrebs-Hepes buffer中に移した。500 μMのNADHを添加し、化学発光数（chemiluminescence：単位 RLU：relative light units）を、ルミノメーター（MULTI-BIOLUMAT LB9505C 又はLB-953, ワラック・ベルトールド社）を用いて37℃で10分間測定した。総化学発光数は、測定時間（横軸）に対し、化学発光数（縦軸）をプロットした曲線の曲線下面積（AUC）により算出した。測定した総化学発光数値を、血管リング標本の湿重量で割付け、大動脈単位重量当たりの・O₂-産生量に標準化した。

投薬した糖尿病ラットの標準化した化学発光数をA、投薬していない糖尿病ラットの標準化した化学発光数をB、正常ラットの標準化した化学発光数をCとし、下記式により抑制率（%）を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - \left((A - C) / (B - C) \right) \times 100$$

結果を下表に記す。

【表 3】

代表化合物の糖尿病ラットの大動脈NAD(P)H oxidase活性抑制作用～1		
	化学発光数 ($\times 10^5$ RLU/大動脈湿重量 mg)	抑制率 (%)
正常ラット	4.4 \pm 1.0	---
糖尿病ラット	14.6 \pm 3.4	---
化合物A 10 mg/kg投与群	3.8 \pm 0.6	105.8 %
平均 \pm 標準誤差		

【0027】

【表 4】

代表化合物の糖尿病ラット大動脈NAD(P)H oxidase抑制作用～2				
	抑制率 (%)			
	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg
化合物A	---	---	76.9 %	---
化合物B	---	---	---	88.5 %
化合物C	45 %	90 %	---	---
化合物D	44 %	72 %	---	---

【0028】

各表に示したとおり、高糖下培養細胞、又は、糖尿病ラット大動脈のNAD(P)H oxidase活性は正常に比較して上昇していた。上昇したNAD(P)H oxidase活性に対し、代表化合物A～Hは抑制作用を示した。

【0029】

試験例 3 正常ラットNAD(P)H oxidaseに対する作用

正常Wistar系ラット（雄性、日本SLCより購入）に3日間薬剤を投与し、実施例1と同様の方法で、大動脈のNAD(P)H oxidaseによる $\cdot O_2$ -産生量を測定した。

投薬したラットの標準化した化学発光数をA、投薬していないラット（対照群）の標準化した化学発光数をBとし、下式により抑制率（%）を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - (A/B) \times 100$$

結果を下表に示す。

【表 5】

正常ラット大動脈NAD(P)H oxidase活性に対する作用		
	化学発光数 ($\times 10^5$ RLU/大動脈湿重量 mg)	抑制率 (%)
対照群	3.96 \pm 2.9	-----
化合物A 10 mg/kg	3.89 \pm 3.0	1.8
化合物B 10 mg/kg	4.01 \pm 6.0	-1.3

【0030】

化合物A及びBは、正常ラットの・O₂-産生に影響を与えなかった。

【0031】

試験例 4 大動脈NAD(P)H oxidase酵素阻害作用

(方法)

試験例2と同様の方法で、糖尿病ラットの腹部大動脈より放血後、胸部大動脈を摘出した。摘出した大動脈をKrebs-Hepes buffer中に浸し、周辺組織を除き、約5mmのリング標本を作製した。リング標本を、被験薬（化合物A、化合物B、又は、DPI（SIGMAより購入））を添加したKrebs-Hepes buffer中、37℃、10分間プレインキュベートした後、リング標本を0.25mM lucigeninを含むKrebs-Hepes buffer中に移した。500 μ MのNADHと被験薬を添加し、化学発光数を37℃で10分間測定した。測定にはルミノメーター（MULTI-BIOLUMAT LB9505C、又は、LB-953, ワラック・ベルトールド社）を使用した。

総化学発光数は、測定時間（横軸）に対し、化学発光数（縦軸）をプロットした曲線の曲線下面積（AUC）により算出した。

測定した化学発光数値を、血管リング標本の湿重量で割付け、大動脈単位重量当たりの・O₂-産生量に標準化した。

被験薬を添加したリング標本の標準化した化学発光数をA、溶媒を添加したリング標本（コントロール）の標準化した化学発光数をBとし、下式により抑制率

(%) を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - (A/B) \times 100$$

結果を下表に記す。

【表 6】

糖尿病ラット大動脈NAD(P)H oxidase酵素阻害作用		
	化学発光数 ($\times 10^5$ RLU/大動脈湿重量mg)	抑制率 (%)
コントロール	9.3 \pm 0.5	—
化合物 A 0.1 μ M	9.1 \pm 1.7	2.2 %
化合物 A 1 μ M	9.2 \pm 1.7	1.1 %
DPI 200 μ M	5.2 \pm 1.1	45.1 %
平均 \pm 標準誤差		

【0032】

(結果)

化合物 A は NAD(P)H oxidase 酵素阻害作用を示さなかったが、非特異的 flavoprotein inhibitor である DPI は NAD(P)H oxidase 酵素阻害作用を示した。

【0033】

試験例 5 白血球に対する作用

(方法 1)

正常 SD 系ラット (雄性、日本チャールスリバーより購入) の腹部大動脈より採血し、直ちに血液 3ml に対し 42ml の氷冷 Lysis buffer と混和し、5 分間氷冷した。4℃、1100rpm で 5 分間遠心分離した。沈渣を氷冷 Lysis buffer で再懸濁し、再び 4℃、1100rpm で 5 分間遠心分離した。この操作を 2-3 回繰り返し、白血球を得た。得られた白血球を Krebs-Hepes buffer で懸濁し細胞数を調整した。0.25mM lucigenin および被験薬を添加後、Phorbol 12-myristate 13-acetate (以下、PMA と記す。SIGMA より購入。) を添加し、化学発光数を 37℃ で 10 分間測定した。

測定にはルミノメーター (Auto Lumat Plus, ワラック・ベルトールド社) を使用

した。総化学発光数は、測定時間（横軸）に対し、化学発光数（縦軸）をプロットした曲線の曲線下面積（AUC）により評価した。

被験薬を添加した白血球懸濁液の総化学発光数をA、溶媒を添加した白血球懸濁液（対照）の総化学発光数をBとし、下式により抑制率（%）を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - (A/B) \times 100$$

【0034】

（方法2）

正常ラット、又は、糖尿病ラット（SD系雄性、日本チャールスリバーより購入）に3日間被験薬を投薬した。4日目に腹部大動脈より採血し、方法1と同様の方法で、白血球を得た。得られた白血球をKrebs-Hepes bufferで懸濁し、細胞数を調整した。0.25mM lucigeninを含む被験薬、Phorbol 12-myristate 13-acetate（SIGMAより購入。以下、PMAと記す。）を添加し、化学発光数を37℃で10分間測定した。測定にはルミノメーター（Auto Lumat Plus、ワラック・ベルトールド社）を使用した。総化学発光数は、測定時間（横軸）に対し、化学発光数（縦軸）をプロットした曲線の曲線下面積（AUC）により評価した。

投薬したラットの総化学発光数をA、投薬していないラット（Control群）の総化学発光数をBとし、下記式により抑制率（%）を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - (A/B) \times 100$$

【0035】

試験例1から5の結果より、上記一般式（I）～（VIII）に示されるような化合物は、過剰に発現若しくは活性化したNAD(P)H oxidaseに対する阻害作用、又は、NAD(P)H oxidase活性化の過程に対して阻害作用を有する化合物であることが理解できる。

【0036】

試験例6 酸化LDL（低密度リポタンパク質；low-density lipoprotein、以下、LDLと記す。）によるNAD(P)H oxidase発現抑制に対する作用

（方法）

HUVECを24穴コラーゲンコートプレートに播種した。化合物Aを添加し、24hr後に酸化LDL（健常人ボランティア血液より調製）を100 μ g/ml添加した。

酸化LDL添加24hr後に、MgExtractor (TOYOBO) を用いてtotal RNA を抽出し、DNaseI処理 (日本gene社試薬) を行った。

一部を分取、吸光度 (OD₂₆₀) を測定し、total RNA の濃度を測定した。

得られたtotal RNA 100 ngを用いてRT (reverse transcription) 反応 (ABI社試薬) を行い、cDNAを合成した。

cDNAのうち10 μ lを用いてPCR (polymerase chain reaction) を行い (ABI社試薬)、NAD(P)H oxidase主要構成成分であるp22^{phox}、内在controlとして β -actinの発現量を測定した。

p22^{phox}の発現量は β -actinの発現量で標準化し、正常の (p22^{phox}) / (β -actin) の発現量を100%として表した。

【表 7】

p22 ^{phox} 発現に対する作用		
正常群	酸化LDL添加群 (対照群)	酸化LDL添加 +化合物A 0.1 μ M
100.00 \pm 2.01 #	165.21 \pm 8.05	116.64 \pm 16.61 *
*; p<0.05 (対照群に対するt検定)、# ; p<0.05 (対照群に対するt検定) 平均 \pm 標準誤差		

【0037】

(結果)

酸化LDL添加によりHUVECのp22^{phox}発現は約1.6倍上昇した。化合物A添加群のp22^{phox}発現は添加前と比較して1.2倍であり、化合物Aはp22^{phox}発現上昇を抑制した。すなわち、化合物Aは酸化LDL刺激によるNAD(P)H oxidase過剰発現を抑制した。

【0038】

試験例 7 動脈硬化抑制作用

(方法)

NZWウサギ (雄性、日本SLCより購入) に0.67%コレステロール含有飼料を40g/kg/day与え、12週間飼育した (対照群)。化合物投与群では、上記飼料に化合物

を混ぜたものを動物に与えた。投与期間中2週間毎に耳介静脈よりヘパリン処理したキャピラリーで採血し、3000r.p.m.で10min.遠心して血漿を得、血漿中のトータルコレステロール（以下、TCと略す。）値及び中性脂肪（以下、TGと略す。）は測定キットを用いて酵素法で測定した。

コレステロール含有飼料投与12週間後、ペントバルビタール麻酔下に頸動脈を剥離・摘出した後、脱血し、大動脈を摘出した。

摘出した頸動脈を、直ちにKrebs緩衝液に浸し、慎重に周囲の組織を除去し、内皮細胞に損傷を与えないようにして、リング標本作製した。標本を95% O₂-5% CO₂ 混合ガスの通気下に、37℃のKrebs緩衝液を満たしたマグナス槽中に懸垂し、2gの張力負荷にて定常状態となった後、実験を行った。

弛緩反応を測定するためにノルエピネフリンであらかじめ標本を収縮させておき、収縮が一定になった時点でアセチルコリンを累積的に添加した。血管の弛緩率は10 μ Mのノルエピネフリンにより引き起こされた収縮を100%として求めた。

張力はトランスジューサー（日本光電）を用いて、等尺性に測定した。対照群に対する二元配置分散分析（Dunnett法）により有意差検定を行った。

摘出した大動脈は弓部・胸部・腹部大動脈に分割し、10%ホルマリン緩衝液で固定後、写真撮影を行い、大動脈に沈着した脂質面積を測定し、大動脈面積に対する脂質沈着部の面積の割合を求めた。

結果を下表に示した。

【表 8】

ウサギ動脈硬化モデルにおける脂質沈着に対する効果		
	脂質沈着面積(%)	
	胸部大動脈	腹部大動脈
正常食群	0.2 \pm 0.1 ##	2.1 \pm 0.7 ##
対照群（コレステロール食負荷）	93.5 \pm 4.0	67.6 \pm 8.6
化合物A 1 mg/kg	62.1 \pm 10.0 **	25.4 \pm 6.2 **
化合物A 10 mg/kg	56.5 \pm 10.5 **	18.2 \pm 2.2 **
**; p<0.01 (対照群に対するDunnett法)、##; p<0.01 (対照群に対するt検定)		
平均 \pm 標準誤差		

【0039】

【表9】

コレステロール負荷12週後の血中脂質に対する作用		
	血漿中脂質濃度 (12W後)	
	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)
正常食群	34.1 ± 3.3##	48.8 ± 5.5 ##
対照群 (コレステロール食負荷)	2212.8 ± 284.1	289.8 ± 33.1
化合物A 1 mg/kg	1895.3 ± 244.6	271.9 ± 10.5
化合物A 10 mg/kg	1887.9 ± 103.9	252.0 ± 19.3*
*: p<0.05 (対照群に対するDunnett法)、#: p<0.01 (対照群に対するt検定) 平均±標準誤差		

【0040】

(結果)

67% コレステロール含有飼料投与でControl群 (対照群) の血漿中のTC値は約2000 mg/dlに上昇した。いずれの化合物も血漿中のTC、TG値は対照群と比較して有意な低下作用を示さなかった。

化合物Aは動脈硬化のリスクファクターである高脂血症の改善作用なしに、胸部、腹部大動脈への脂質沈着を有意に抑制した。この結果は、血漿中に高濃度の脂質が存在している状態においても、化合物Aが組織への脂質沈着を抑制することを示している。

頸動脈の内皮依存性血管弛緩反応について、アセチルコリン (以下、AChと記す。) 10^{-8} ~ 10^{-5} Mの濃度反応曲線を図1に示した。

対照群のAChによる弛緩反応は、Normal群 (正常食群) に対して有意に減弱した。一方、化合物A投与群のAChによる弛緩反応は、対象群と比較して、有意に改善された。

【0041】

試験例8 内膜肥厚抑制作用

ペントバルビタール麻酔下に、SD雄性ラット (日本チャールスリバーより購入) を背位固定し、左頸動脈を露出した。外頸動脈より、動脈塞栓除去カテーテル

(2Fr., フォガティ) を、バルーンを膨らませない状態で、大動脈分岐部まで挿入した。バルーンを膨らませ、回転させながら挿入部まで引いた。この操作を3回繰り返して、頸動脈の内皮細胞を剥離した。操作終了後、カテーテルを引き抜き、外頸動脈を結紮し、医療用クリップ（ベクトン・ディッキンソン）で切開部をとじ合わせた。化合物Aを0.7% トラガント溶液に懸濁し、1, 3, 10mg/kgの用量を、1日1回経口投与した。1日目の投与は、頸動脈剥離直後におこなった。

内膜剥離から2週間後、ペントバルビタール麻酔下、3%エバンスブルー液を静脈内投与した。30分後開腹し、0.01M リン酸緩衝液で大動脈より全身灌流した後、頸動脈を摘出した。摘出した頸動脈をホルマリン固定し、青染部を輪切りにし、エラスチカ・ワンギーゾン染色した。新生内膜と中膜の面積をデジタイザーで測定し、内膜／中膜比を算出した。抑制率を以下の式で算出した。

抑制率 (%) = 100 - (化合物投与群の内膜／中膜比) / (対照群の内膜／中膜比) × 100

【表10】

内皮細胞剥離による内膜肥厚抑制作用				
	対照群	化合物A 1 mg/kg	化合物A 3 mg/kg	化合物A 10 mg/kg
内膜／中膜比	1.034±0.047	0.709±0.059	0.619±0.039*	0.563±0.035**
抑制率	-	31.4 %	40.1 %	45.6 %
* ; p<0.05, **; p<0.01 (Control群に対するDunnett法)、平均±標準誤差				

【0042】

(結果)

対照群と比較して、化合物A投与群では、内皮細胞剥離による内膜肥厚の有意な抑制がみられた。

【0043】

試験例9 ラット左冠動脈結紮心筋梗塞モデルに対する作用

(方法)

SD系雄性ラット（日本SLCより購入）をエーテル麻酔下に背位固定し、Selye H.らの方法（Angiology, 1960, 11, 398）に従い、胸骨左線に沿って縦切開を加え開

胸し、心臓を露出させた。左冠動脈を起始部から1-2mmの部位を4号シルク糸により結紮し、心臓を元に戻し、素早く脱気した後、閉胸した。心電計（日本光電）にて心筋梗塞の状態であることを確認した。結紮24時間後に腹部大動脈から採血後、脱血致死させ心臓を取り出し、中央部の横断輪状切片を、0.1M リン酸緩衝液に溶解した1 % 塩化2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム（以下、TTCと記す。）溶液中、遮光下で20分インキュベートした。その後、切片をホルマリン緩衝液で固定し、切片をトレースし、梗塞部（TTC非染色部）面積、左心室面積を算出した。冠動脈結紮直後、化合物Aを1% CMC溶液に懸濁し、経口投与した。

抑制率は次式で算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - 100 \times \{ (\text{化合物投与群の梗塞率}) / (1\% \text{ CMC投与群の梗塞率}) \}$$

$$\text{梗塞率 (\%)} = (\text{梗塞部面積} / \text{左心室面積}) \times 100$$

また、化合物A（1 mg/kg）を結紮15分、1時間、3時間後に経口投与し、梗塞率抑制作用を検討した。結果を下表に示す。

【表 11】

ラット急性心筋梗塞モデルに対する作用				
-	投与なし	化合物A 0.1 mg/kg	化合物A 0.3 mg/kg	化合物A 1 mg/kg
梗塞率 (%)	40 %	40 %	17.2 % **	6.3 % **
抑制率 (%)	—	0 %	57 %	84.3 %
**: p<0.01 (化合物非投与群に対するDunnett法)				

【0044】

【表 12】

表 12 結紮後投与時の梗塞率に対する作用				
結紮後投与時間	投与なし	15分後	1時間	3時間
梗塞率 (%)	40 %	10.5 % **	16.7 % **	29.3 % *
抑制率 (%)	—	73.8 %	58.3 %	26.8 %
* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$ (化合物非投与群に対するDunnett法)				

【0045】

(結果)

化合物非投与群において、左心室に対する梗塞率は約40%であったのに対し、化合物A投与群は、0.3mg/kg、1mg/kg投与群で有意な梗塞巣進展の抑制作用があった。

【0046】

試験例 10 ウサギ虚血再灌流心筋梗塞モデルに対する作用

(方法)

NZWウサギ(雄性、日本SLCより購入)を背位固定後、ペントバルビタール麻酔し開胸したのち、左冠動脈基始部に4号シルク糸をかけ、さらに長さ1cmのポリエチレンチューブをあてて糸で左冠動脈を結紮した。結紮2時間後にポリエチレンチューブ上の糸を切断し、血流を再開させた。再灌流4時間後に、あらかじめかけておいたもう1本の糸で冠動脈基始部を結紮し、3% エバンスブルー液を1 mL/kg静脈内投与した。5分後に過剰量のペントバルビタールを投与し心臓及び大動脈を摘出した。心臓は幅3mmの輪状に切断し、左心室面積、虚血領域(エバンスブルー非染色部)をトレースした。

さらに1% TTC溶液中で30分インキュベートした後、梗塞巣(TTC非染色部)をトレースした。化合物A (1 mg/kg) は結紮1時間前に投与した。

左心室面積に対する虚血巣、梗塞巣の割合を算出した。

心臓の一部を液体窒素で凍結し、クラッシャーにて粉碎、リン酸緩衝液でホモジネートした。この懸濁液を3000r.p.m.で10分、さらに上清8mLを15000r.p.m.で15分遠心分離し、得られた上清をo-dianisidine dihydrochlorideを含むリン酸緩

衝液と混合し、25℃、30分静置したのち吸光度 (OD₄₆₀) を測定し、ミエロパーオキシダーゼ (MPO) 活性を求めた。MPO活性は正常群の値を100%として表した。結果を下表に示す。

【表 13】

ウサギ心筋梗塞モデルに対する作用		
	壊死面積／虚血面積	心筋内MPO活性
正常群	—	100 %
対照群	58 %	248 % ##
化合物A投薬群	14 % *	128 % *
* ; p<0.05 (Control群に対する t 検定) , ## ; p<0.01 (正常群に対する t 検定)		

【0047】

(結果)

対照群では、虚血に陥った左心室のうち58%が壊死した。それに対し化合物A投与群では、この割合は14%となり、有意な抑制作用が認められた。また、心筋内への白血球浸潤の指標となるMPO活性は、対照群（梗塞心臓）で正常群に対して有意に増加したが、化合物A投与群では対照群に対して有意に抑制された。

【0048】

試験例 11 ウサギ慢性心筋梗塞（心不全）モデルに対する作用

(方法)

NZWウサギ（雄性、日本SLCより購入）を背位固定後、ペントバルビタール麻酔し開胸したのち、左冠動脈基始部に4号シルク糸をかけ、さらに長さ1cmのポリエチレンチューブをあてて糸で左冠動脈を結紮した。結紮2時間後にポリエチレンチューブ上の糸を切断し、血流を再開させた。再開通2時間後に化合物A（1 mg/kg）を1回投与し、その後、1日1回12週間にわたり投与した。12週間後に過剰量のペントバルビタールを投与した後、心臓を摘出し、その全重量、及び左心室中央の壁の厚さを測定した。結果を下表に示す。

致死率と心重量、左心室厚により化合物を評価した。

【表 14】

累積死亡率に対する作用			
	～結紮2週間 (累積死亡数/n)	～結紮4週間 (累積死亡数/n)	死亡率
非投与群	3/20	6/20	30 %
化合物A投与群	0/12	1/12	8 %

【0049】

【表 15】

心重量に対する作用		
	心重量	左心室厚
正常群	1.85 g/kg body weight #	1.23 mm #
非投与群	2.35 g/kg body weight	1.01 mm
化合物A投与群	2.05 g/kg body weight *	1.17 mm *
*:p<0.05 (対照群に対する t 検定)、#; p<0.05 (対照群に対する t 検定)		

【0050】

(結果)

ウサギ虚血再灌流心筋梗塞後、12週間で被験薬非投与群は、心重量の増加及び左心室厚の薄弱化が認められ、心筋梗塞後の心不全への移行時にみられる心臓の膨化・腫大を示した。化合物A投与群では、心重量の増加及び左心室厚の薄弱化が抑制された。

【0051】

試験例 12 脳梗塞モデルに対する作用 (虚血性脳障害モデル)

(方法)

ICR系雄性マウス (日本SLCより購入) をエーテル麻酔し、背位に固定し、両総頸動脈を糸で結紮した。すばやく傷をふさぎ、直ちにマウスをケージ内に解放、30分毎に240分までの死亡の有無を確認し、各群の累積死亡率を求めた。

総頸動脈結紮 1 時間前に化合物を経口投与した。

【表 16】

累積死亡率に対する作用				
死亡数 (累積死亡率)	対照群	化合物B 1 mg/kg	化合物B 3 mg/kg	化合物B 10 mg/kg
0 ~ 30	22 (71.0 %)	15 (78.9 %)	11 (57.9 %)	8 (40.0 %)
30 ~ 60	5 (87.1 %)	2 (84.2 %)	5 (84.2 %)	6 (70.0 %)
60 ~ 90	0	2 (94.7 %)	0	2 (80.0 %)
90 ~ 120	2 (93.5 %)	0	0	1 (85.0 %)
120 ~ 150	0	0	1 (89.5 %)	0
150 ~ 180	2 (100 %)	0	0	0
180 ~ 210	0	0	0	0
210 ~ 240	0	0	0	0
計	31	20	19	19

【0052】

(結果)

化合物B投与群では、両頸動脈結紮による脳虚血モデルに対して、死亡率の改善効果が見られた。

【0053】

【発明の効果】

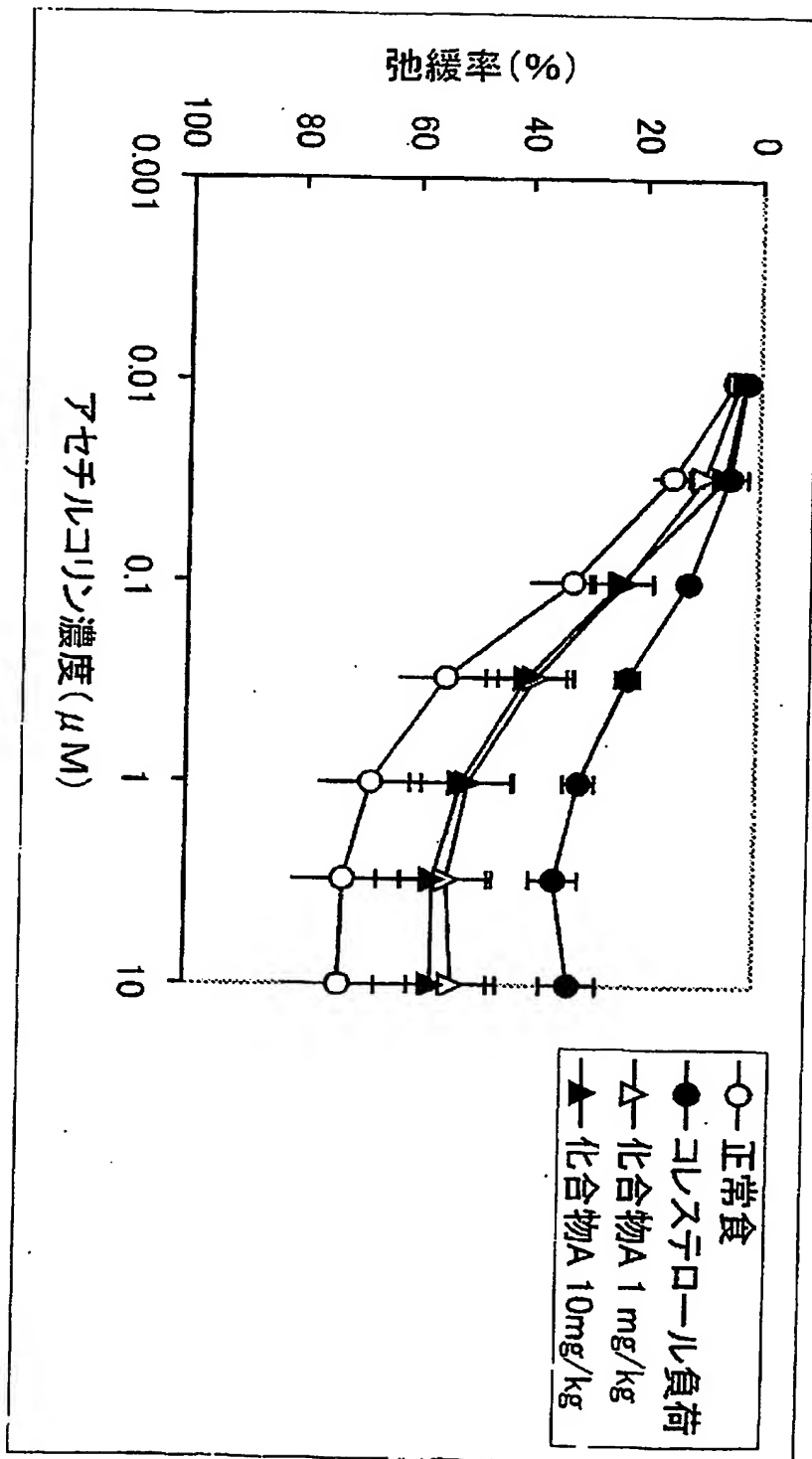
本発明の化合物は、上記のように、NAD(P)H oxidaseに起因する疾患、より好ましくはNAD(P)H oxidase過剰発現に起因する疾患の予防及び／又は治療剤として期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Achによる内皮依存性弛緩反応に対する化合物の効果を示した図である。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 NAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患若しくは疾患増悪に対する優れた予防及び／又は治療剤を提供することを目的とする。

【解決手段】 血管細胞系及び／又は心臓・腎臓・網膜・ミクログリア・腫瘍細胞等の組織において、過剰に発現又は活性化したNAD(P)H oxidaseのみに対する阻害作用又はNAD(P)H oxidase活性化の過程に対して阻害作用を有する化合物を有効成分として含有するNAD(P)H oxidase過剰発現若しくはNAD(P)H oxidase活性化に起因する疾患若しくは疾患増悪の予防及び／又は治療剤。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 0 3 5 7 6
受付番号	5 0 3 0 0 5 7 8 3 6 7
書類名	特許願
担当官	関 浩次 7 4 7 5
作成日	平成 1 5 年 4 月 1 0 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 1 5 年 4 月 8 日
-------	------------------

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 0 3 5 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 6 7 2 5]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 1 0 月 1 日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 6 番 9 号

氏 名 三菱ウェルファーマ株式会社